

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310133
 研究課題名(和文) 大腸菌の全ての機能未知転写因子の支配下遺伝子群の同定と制御様式の解明
 研究課題名(英文) Identification of Regulation Targets and Analysis of Regulation Modes by Uncharacterized Transcription Factors from *Escherichia coli*
 研究代表者
 石浜 明 (ISHIHAMA AKIRA)
 法政大学・生命科学部・教授
 研究者番号：80019869

研究成果の概要： 転写酵素 RNA ポリメラーゼの転写対象遺伝子群の選択は、転写因子との相互作用によって決定される。約 300 種類の大腸菌転写因子のうち、約 100 種は制御機能未知である。本研究では、機能未知転写因子が認識する配列から制御機能を同定する Genomic SELEX 法を開発した。純化転写因子を利用した解析から、各転写因子の制御対象遺伝子群の同定に成功したことで、ゲノム転写包括制御の全貌解明の展望が開けた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム調節、転写、遺伝子、細菌、発現制御

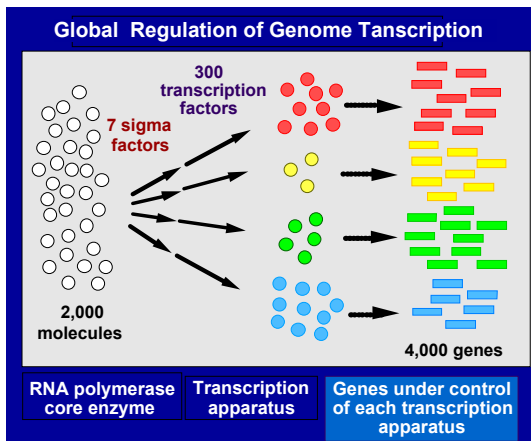
1. 研究開始当初の背景

ゲノム全構造が解明された後の、21 世紀の生命科学の攻目標は、ゲノムに存在する全遺伝子の生理機能を同定し、また発現し利用される遺伝子が選択される機構を解明することであった。こうしたゲノムの全体像を知る研究には、個別遺伝子の情報が多く、ゲノム遺伝子総数が少ない大腸菌は、格好の研究対象であった。そうした時代背景で、モデル生物・大腸菌ゲノムの約 4,400 の遺伝子が、生存環境に応じて、ゲノムから転写をする遺伝子群を選択する機構の解明を目指した研究でポストゲノムシーケンス時代の生命科学の先陣をきる決意をした。

2. 研究の目的

大腸菌ゲノムの 4,400 遺伝子から転写される遺伝子の選択機構について、研究代表者・石浜は、転

写酵素 RNA ポリメラーゼが、転写因子との会合で、選択対象遺伝子を選択することで決定されるとの理論を提唱していた。理論を検証する目的では、大腸菌に予想されている約 300 種の転写因子のそれぞれが支配し制御する遺伝子群を同定し、その制御様式を網羅的に解析することが求められる。モデル生物として最も理解されて来た大腸菌でも、研究開始時では、約 100 種類の転写因子については、機能未知であった。従って、大腸菌全転写因子の制御機能解析によるゲノム転写制御の全体像理解を目指して、本研究では、機能未知転写因子全 100 種の支配下遺伝子群の同定と制御機構の解明を目指し、そのための実験方法と資材開発を含めた研究構想を提案した。



3. 研究の方法

本研究では、機能未知転写因子の支配下遺伝子群の同定を転写制御様式の解明を目指して、以下の研究構想を提唱した。

- (1) 機能未知転写因子全 100 種の遺伝子の発現クローンを構築し、蛋白を純化精製する。
- (2) 純化転写因子を利用し、先に我々が開発した Genomic SELEX 法で、各転写因子が認識結合する DNA 塩基配列を決定する。
- (3) 転写因子結合部位に隣接する遺伝子群の試験転写因子による制御を、in vitro 及び in vivo 両面で解析し点検する。
- (4) 転写因子の細胞内濃度を定量的 Western 法で計測し、またその活性制御に影響する要因・要素を、Phenotype Microarray システムで探索する。
- (5) これらを統合して、機能未知転写因子 100 種のゲノム転写制御への関わりに関するモデルを提唱する。

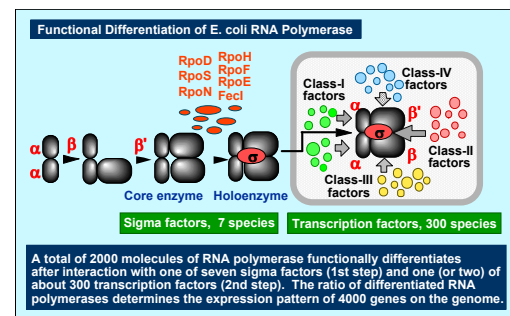
4. 研究成果

上記の研究計画で、3 年間にわたって研究を実施し、以下の成果を得た。

- (1) 大腸菌転写因子300種のうち、290種の発現系を確立し、280種に関しては精製純化した。
- (2) 純化転写因子と、大腸菌ゲノムDNA断片混合物を利用して、転写因子が認識結合するDNA塩基配列を決定するGenomic SELEX法と、DNA microarray を利用してゲノム上の配列由来を同定する SELEX-chip法を開発した。
- (3) 転写因子結合配列から、制御支配下遺伝子群を予測する方法を確立した。
- (4) 機能未知転写因子100種をほぼ全て純化し、Genomic SELEXとSELEX-chip解析を実施し、少なくとも半分については、純化転写因子だけで、特定遺伝子群を標的として結合することを実証した。
- (5) 純化蛋白だけでは、特定DNAの認識結合を示さなかった転写因子については、特異性を付与する要素・要因を、Phenotype Microarrayで探索した。
- (6) 解析転写因子欠損大腸菌変異系統を利用し、

生体内での、試験転写因子による予測支配下遺伝子群の制御については、Northern blot法などで、mRNAを直接計測することで実証した。

(7) 多数の転写因子の支配下遺伝子群を同定出来たことで、多くの新しい概念を発見した。例えば、①10種類以上のプロモーター群を支配する新種「包括転写因子」の発見、②10種類以上もの転写因子の制御を受ける「多因子支配プロモーター」の発見、③ひとつの転写因子支配下に別の転写因子遺伝子が含まれる「転写因子ネットワーク」の発見など、原核細胞の転写制御の新しい局面を明らかにすることが出来た。



(8) 機能未知転写因子の解析に加えて、生理機能の一端が知られている転写因子の一部についても解析を行なったところ、既知標的以外にも、多数の遺伝子を制御していることが判明した。従って、今後は、制御機能既知転写因子約 200 種についても、解析を広げることとした。

本研究を発展させて、ひとつの生物の全ての転写因子の調節標的遺伝子群の同定と、制御機構の全貌の解明を目指す、新たな攻め目標が生まれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 46 件)

- ① Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Involvement of leucine-reponse transcription factor Leu0 in regulation of the genes for sulfa-drug efflux. *J. Bacteriol.* **191**, in press (2009) [査読有]
- ② Hasegawa, A., Ogasawara, H., Kori, A. and Ishihama, A.: AllR is the

- Allantoin/Glyoxylate-Sensing Master Regulator of the Genes for Degradation and Reutilization of Purines. *Microbiology*. **154**, 3366-3378 (2008) [査読有]
- ③ Mitobe, J., Ishihara, T., Ishihama, A. and Watanabe, H.: Involvement of RNA binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. *J. Biol. Chem.* **283**, 5738-5747 (2008) [査読有]
- ④ Shimada, T., Ishihama, A., Busby, S. J. W. and Grainger, D. C.: The *Escherichia coli* RutR transcription factor binds at targets within genes as well as intergenic regions. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3950-3955 (2008) [査読有]
- ⑤ Umezawa, Y., Ogasawara, H., Shimada, T., Kori, A. and Ishihama, A.: The uncharacterized YdhM is the regulator of the *nemA* gene, coding for N-ethylmaleimide reductase. *J. Bacteriol.* **190**, 5890-5897 (2008) [査読有]
- ⑥ Yamamoto, K., Ogasawara, H. and Ishihama, A.: Involvement of multiple transcription factors for metal-induced *spy* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **133**(16), 6080-6084 (2008) [査読有]
- ⑦ Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: Genomic SELEX search for target genes under the control of PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.*, **189**, 4791-4799 (2007) [査読有]
- ⑧ Ogasawara, H., Ishida, Y., Yamada, K., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 5534-5541 (2007) [査読有]
- ⑨ Shimada, T., Hirao, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A.: RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. *Mol. Microbiol.* **66**, 744-779 (2007). [査読有]
- ⑩ Ohniwa, R. L., Mirikawa, K., Kim, J., Ohta, T., Ishihama, A., Wada, C. and Takeyasu, K.: The dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *EMBO J.* **25**, 5591-5602 (2006) [査読有]
- [学会発表] (計 72 件)
- ① Ishihama, A.: Genomic SELEX search for regulation targets by 100 species of uncharacterized transcription factors from *E. coli*. 12th Transcription Assembly, March 2-5, 2009. Chandigarh, India
- ② Ishihama, A.: Multi-Scale Genetics towards Understanding the Regulatory Roles of All Transcription Factors from a Single Organism *Escherichia coli*. Asian Conference on Transcription (ACT), 10th Meeting, Jan. 13-16, 2008. Bangalore, India
- ③ Ishihama, A.: 20 years of progress with RNA polymerase. 20th RNA Polymerase Workshop. March 16-17, 2008. York, UK
- ④ Ishihama, A. et al.: Multi-factor promoters and multi-factor networks. 20th RNA Polymerase Workshop. March 16-17, 2008. York, UK
- ⑤ Shimada, T., Hirao, K., Kori, A., Yamamoto, K., Grainger, D. C., Busby, S. J. W. and Ishihama, A.: RutR is the uracil/thymine sensing regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. RNA Polymerase Workshop, March, 2007. London, UK,
- ⑥ Ishihama, A., et al.: Multi-Scale Genetics of Transcription Network: Understanding the Regulatory Roles of All 300 Transcription Factors from a Single Organism *Escherichia coli*. Nov. 2007. Nagoya, Japan
- ⑦ Ishihama, A.: The bacterial nucleoid. The 1st Symp. Nuclear Architecture: Chromosome-Chromatin Dynamics, Dec. 2006, Bangalore,

India

- ⑧ Ishihama, A.: Systematic search for regulatory roles of putative transcription factors with unidentified functions. The 10th Transcription Assembly, Dec. 2006. Kolkata, India
- ⑨ 石浜 明: 大腸菌ゲノム転写の包括制御。2008年度「べん毛研究交流会」、2009.3.9-11, 仙台、宮城。
- ⑩ 山本兼由、石浜 明: 細菌の金属ストレスに対する転写応答の包括的な制御機構。日本農芸化学会大会、2008.3.26-29, 名城大学・名古屋。
- ⑪ 石浜 明: ゲノムの転写制御: ひとつの生物のすべての転写因子の調節機能同定の試み。第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会マスターズレクチャー、2007.12.10-14. パシフィコ横浜、横浜。
- ⑫ 石浜 明・山本兼由・小笠原 寛・島田友裕・寺本潤: 細菌の環境金属応答の転写包括制御。第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会ワークショップ「金属イオンの Chemical Biology」、2007.12.10-14. パシフィコ横浜、横浜。
- ⑬ 石浜 明: RNA ポリメラーゼ: ゲノム転写の包括制御機構。シンポジウム”The Origins of Trendy RNAs”、2006.7.15. 北里大学、東京。
- ⑭ 石浜 明、小笠原 寛、島田友裕、寺本 潤、郡 彩子、山田佳代子、平尾貴世、長谷川明子、梅澤喜正、矢吹光史郎、石田雄司、稲葉達也、松井 勝、鍛代悠一、加藤大策: マルチスケール遺伝学: 大腸菌全転写因子の機能同定。シンポジウム「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」、2006.6.30 名古屋大学野依学術交流館、名古屋。
- ⑮ 石浜 明: マルチスケール遺伝学: 大腸菌全転写因子の機能同定。シンポジウム「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」、2006.6.30、名古屋大学野依学術交流館、名古屋。
- ⑯ 石浜 明、小笠原 寛、島田友裕、寺本 潤、郡 彩子、山田佳代子、平尾貴世、長谷川明子、梅澤喜正、矢吹光史郎、成瀬みなみ、石田雄司、稲葉達也、松井 勝、鍛代悠一、田中邦貴: 大腸菌機能未知転写因子の機能解析: 制御標的遺伝子の探索。第6回日本蛋白質科学会年会、2006.4.24-26. 京都。

[図書] (計 6 件)

- ① Ishihama, A.: The nucleoid; an overview. In: *Escherichia coli and Salmonella*

(Neidhardt, F.C., eds.), American Society of Microbiology, Washington, USA (2009)

- ② Ishihama, A. et al.: Multi-scale genetics towards understanding the regulatory roles of all 300 transcription factors from a single organism *Escherichia coli*. In: *Micro-Nano Mechatronics and Human Science* (Fukuda, T. eds.), pp. 35-39 (2007)

[その他]

ホームページ等

<http://www.k.hosei.ac.jp/ceng/fb/teacher/ishihama.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石浜 明 (ISHIHAMA AKIRA)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号: 80019869